

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

# METODE UZGOJA ALGI U UVJETIMA *IN VITRO*

## METHODS OF ALGAL CULTURING

SEMINARSKI RAD

Dorotea Polovi

Preddiplomski studij biologije

Mentor: Doc. dr. sc. Zrinka Ljubeši

Zagreb 2011

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	2
2. POVIJEST UZGOJA ALGI U KULTURAMA .....	3
3. LABORATORIJ ZA KULTURE .....	5
3.1. Laboratorijski .....	pribor
.....	5
3.2. Svjetlost .....	7
3.3. Temperatura .....	8
4. MEDIJ ZA UZGOJ KULTURA .....	9
4.1. Medij za slatkovodne vrste .....	10
4.2. Medij za morske vrste .....	11
4.3. Recepti za naj eš e medije .....	12
5. TEHNIKE IZOLACIJE MIKROALGI .....	14
5.1. Izolacija pomo i mikropipete ili kapalice .....	14
5.2. Izolacija stanica na agar .....	17
5.3. Izolacija makroalgi .....	18
6. KULTURE ALGI KONTAMINIRANE VIRUSIMA .....	19
7. LITERATURA .....	20
8. SAŽETAK .....	21
9. SUMMARY.....	21

## 1. UVOD

Alge su velika i raznolika skupina autotrofnih organizama koji žive u vodenim ili vlažnim staništima. Obuhvaćaju jednostanične organizme veličine uglavnom 20 - 200 µm i višestanične organizme od kojih neki mogu narasti do velikih dimenzija. Mikroskopske alge su najzastupljenije u planktonu (fitoplankton) te predstavljaju jedne od najvažnijih proizvođača organske tvari i kisika na planetu. Ništa manje značajne su bentoske alge. U bentosu također žive i jednostanične i višestanične vrste. Alge su zaslužne da je Zemlja (do njihove pojave pusta i obavijena otrovnim plinovima) postala prostor gdje danas živi itava paleta raznovrsnih organizama. Bile su prva živa bića koja su fotosintezom proizvela kisik. Danas proizvode oko 40 do 50 % kisika u atmosferi te svaki drugi udah zahvaljujemo njima. Kada bi smo 'pakirali' sve stanice algi koje žive u oceanima dobili bismo lanac dužine 386 000 km, a to je jednako udaljenosti Zemlje od Mjeseca!

Imaju iznimno veliku hranjivu vrijednost, a posebno su bogate vitaminom C, mineralima, tiaminom, bjelanjcima i vlaknima, dok sadrže mali postotak masnoća. Sadrže i vitamin B, koji je središnji živani sustav, kosu, nokte i krv. Alge se u prehrani većinom koriste u azijskim zemljama gdje su najviše potrošile Japan, Kina i Koreja. Poznate su i kao ista i organizma, jer ga obnavljaju i štite od raznih izvanjskih utjecaja. Tradicionalna medicina upotrebljava ih za smanjenje opekline, borbu protiv tumora i kao sredstvo postizanja savršene tjelesne težine (reguliraju probavu, smanjuju loš kolesterol, a sve popularnija vrsta koja se koristi u tu svrhu je smeđa alga, *Fucus*). U povijesti se koristile diljem planete, od Azteka, Rusa, Kelta do Afrikanaca. O njihovoj kvaliteti svjedoči činjenica da se algama hrane i astronauti jer povećavaju imunitet i imaju centar za koordinaciju. NASA je proučavala alge kao mogući izvor hrane u svemirskim misijama. Važno je spomeniti da su ih koristili i Rusi za liječenje pacijenata izloženih radijaciji u Černobilu. Danas se premalo važnosti pridaje algama kao indikatorima promjena u okolišu, prije svega vodenim ekosustavima gdje ih borave. Alge brzo reagiraju na onečišćenje te zbog toga rano upozoravaju na problem. Iako su dobar pokazatelj i makroskopske alge (npr. *Ulva* preferira onečišćenje more, dok *Acetabularia* živi u čistom), ipak se češće kao indikatori spominju dijatomeje.

Uzgoj algi u kulturama omogu uje prijeko potrebna istraživanja fiziologije i ekologije ovih važnih organizama.

## 2. POVIJEST UZGOJA ALGI U KULTURAMA

Iako su alge kultivirane preko sto godina, uspjeh je bio ograničen na brzorastuće alge 'korove'. Ferdinand Cohn (1850.) je prvi objavio rad o uzgoju fitoplanktona u kulturi kada je uspio u svom laboratoriju održati jednostaničnog flagelata *Haematococcus* (Chlorophyceae). Tu je proceduru uzgoja nazvao 'kultivacija' iako nije koristio hranidbeni medij. Farmitzin (1871), biljni fiziolog u St. Petersburgu, prvi je pokušao uzgojiti alge u otopini anorganskih soli. Uzgojio je nekoliko zelenih algi, no posebno su značajne dvije vrste koje je determinirao kao *Chlorococcum infusionum* i *Chlorococcum viridis*. Prve zapise o istoj kulturi alga iznio je mikrobiolog Beijerinck (1890). Koristio je bakteriološke tehnike koje je predstavio Robert Koch deset godina ranije te je bio prvi koji je izolirao slobodno živuće *Chlorella*, *Scenedesmus* te simbiotsku zelenu algu iz hidre ('Zoochlorella') i lišaja (kasnije se pokazalo da je to bila *Trebouxia*, vrsta zelene alge koja čini čak 50% zelenih algi koje mogu živjeti u takvoj simbiozi s gljivama). Kasnije je uspostavio iste kulture cijanobakterija (1901.) i dijatomeja (1904.) te otkrio da neke vrste cijanobakterija poput *Anabaena* mogu živjeti u mediju u koji nisu dodane nikakve komponente koje sadrže dušik (1901.). Jednako su značajne studije francuskog mikrobiologa Miquelaa koji je prvi uspostavio iste kulture nekih slatkovodnih i morskih dijatomeja. Predstavio je i nekoliko novih metoda poput korištenja mikropipete za izolaciju stanica alga.



**Slika 1.** Ferdinand Cohn

([www.oocities.org](http://www.oocities.org))

**Slika 2.** Martinus Beijerinck

([www.trueknowledge.com](http://www.trueknowledge.com))

Najraniji medij za uzgoj je naj eš e bila morska voda u koju su dodani nutrijenti poput nitrata, fosfata i silikata. Tridesetih i etrdesetih godina prošlog stolje a medij je unaprije en dodatkom ekstrakata iz tla i tragova metala (Pringsheim, 1946) što je omogu ilo bolju kultivaciju morskih i slatkovodnih vrsta. Klebs (1896.) je pokušao uzgojiti istu kulturu nitastih algi izoliraju i njihove zoospore na petrijevke s agarom. Iako su one neko vrijeme uspješno rasle nije ih uspio o uvati od napada bakterija. Prvi kojem je to uspjelo je bio Zumstein (1900) tako što je pripremio najkiseliji mogu i medij koji nije ubijao alge, a smetao je bakterijama.

Veliki napredak se dogodio pedesetih godina otkri em Dr. L. Provasoli i suradnika (1958) da mikroalge trebaju vitamine za rast, pri emu je vitamin B12 najvažniji. Sljede e njihovo otkri e (1957.) bilo je da se dodatkom komponenti helata može kontrolirati dostupnost metala u mediju za rast, te je time pove an broj vrsta koje se mogu uzgajati u kulturi. Novija otkri a uklju uju medije za ultra- i pikoplankton te potrebu mnogih vrsta za selenijem.

**Slika 3.** Luigi Provasoli

([www.ccmp.bigelow.org](http://www.ccmp.bigelow.org))

Tehnike uzgoja opisane su detaljno u nekoliko knjiga i lanaka (Kufferath 1930, Bold 1942, Pringsheim 1946, Lewin 1959, Stein 1973, Guillard 1975, 1995, Richmond 1986, 2003, Andersen 2005).

### **3. LABORATORIJ ZA KULTURE**

Osnovni problem kod kultiviranja algi je formiranje odgovarajućeg medija koji će imitirati uvjete što sliči prirodnom - iz kakvih je vrsta izolirana, sadržavati hranjive tvari i vitamine potrebne za rast i diobu te prema potrebi spojeve koji će spriječiti razvoj bakterija, virusa ili gljivica a da pritom ne štete samoj kulturi. No, osim toga, moraju se stvoriti dobri preduvjeti za rast stanica u mediju, koji uključuju odgovarajući laboratorijski pribor i mjere sterilizacije te laboratorij u kojem će se održavati konstantni intenzitet svjetlosti i temperatura što sliči prirodnim uvjetima.

#### **3.1. LABORATORIJSKI PRIBOR**

Za pripremu medija potreban je sav pribor za filtraciju poput staklenih boca, aša, tikvica, filter papira, vage, mješalice. Najčešće se koristi stakleni pribor no može poslužiti i plastični. Za uzgoj kultura najčešće se koriste staklene ili plastične petrijevke, Erlenmeyerove tikvice, epruvete. Prilikom izolacije stanica mogu se koristiti pipete ili češće staklene kapalice (ili bakteriološke eze kod prijenosa stanica sa agara) koje se predhodno obrade nad plamenikom da se stvori što tanji vrh kojim se mogu izolirati točno određene, željene stanice. Pri tome se također koristi i gumena cijevica koja se poveže s kapalicom te omogućava laborantu da strujom zraka uvlači medij sa stanicama u kapalicu kako bi se prenesla u novi medij ili na predmetno stakalce.



**Slika 4.** Osnovni laboratorijski pribor  
za izolaciju stanica

Ponekad problem mogu predstavljati benti ke vrste dijatomeja koje se vrsto prijupe uz stijenke posu a te ih je teško izolirati a da se pritom stanice ne oštete. U takvim slu ajevima bolje je koristiti stakleno posu e nego plasti no ili malene staklene kuglice koje se stave u npr. petrijevku (predhodno sterilizirane) te se lako prenose u novo posu e.

Od primarnog je zna aja da sav pribor koji se koristi bude steriliziran ili barem dezinficiran. Sterilizacija je proces kojim se potpuno odstranjuju ili uništavaju svi mikroorganizmi i njihove spore s predmeta, instrumenata i materijala do te mjere da se na standardnim medijima za kultiviranje ne mogu dokazati. Najdjelotvorniji i najpopularniji na in sterilizacije je autoklaviranje. Najpogodniji je na in za sterilizaciju svih vrsta materijala koji dobro podnose visoke temperature. Provodi se u autoklavima. Ovu sterilizaciju odre uju temperatura, tlak vodene pare i vrijeme. Temperatura od 121°C koristi se za sterilizaciju gumenih predmeta, plastike i otopina, a 134°C za tekstilne predmete i metalne instrumente. Vrijeme sterilizacije ovisno je o temperaturi, te e trajati dulje ako je temperatura niža. Sterilizacija na 134°C ne smije trajati kra e od 5 min, a sterilizacija na 120°C mora trajati 20 minuta. Autoklav je izra en od specijalnog elika, sastoji se od unutrašnjag i vanjskog plašta izme u kojih je prostor ispunjen parom pod tlakom. esto se primjenjuje i metoda žarenja - naj eš e za ušice eze ili sli ne predmete. No, prije upotrebe ve steriliziranog posu a, poželjno ga je još dezinficirati deterdžentom ili 70%-tnim alkoholom da se uklone prašina, spore i mikroorganizmi koji iz zraka ili sa podloge u me uvremenu padnu na pribor.



**Slika 5.** Autoklav

([www.sci.muni.cz](http://www.sci.muni.cz))



**Slika 6.** Mikroskop te uzorci pod mikroskopom

([www.hib.no](http://www.hib.no))

([www.abwassermarkt.de](http://www.abwassermarkt.de))

Za promatranje izoliranih stanica ili čistavih kultura potreban je dobar mikroskop. Ukoliko se mikroskop poveže sa elektronskim računalom slika se može gledati na monitoru. Pri tome postoji mogućnost za fotografiranje kulture te spremanje fotografija što omogućava kvalitetnije praćenje promjena u kulturi te bilježenje rezultata istraživanja. Ovisno o tipu mikroskopa mogu se koristiti određene metode brojanja stanica kada je potrebna kvantitativna analiza. Za Utermöhl metodu treba nam inverzni mikroskop, dok za Sedgwick Rafter metodu, Lund metodu i Neubauer komoru se koristi klasični mikroskop sa okularima postavljenim iznad ploče.

### 3.2. SVJETLOST

Preosvijetljenost može biti velika pogreška pri uzgoju kultura. Osim što osvijetljenje može uzrokovati lokalna pregrijavanja postoji opasnost i od fotorespiracijskog stresa. Naime, enzim rubisko koji je ključan u procesu fotosinteze ujedno je karboksilaza i oksigenaza, što znači da na svoje aktivno mjesto može vezati ili ugljikov dioksid ili kisik. Pri prevelikom osvijetljenju i temperaturi u stanicama se nakuplja kisik te se veže za enzim umjesto ugljikovog dioksida. Pri tome se smanjuje stopa fotosinteze a povećava stopa fotorespiracije. Iako cijanobakterije i neke alge imaju na membranama crpke koje održavaju koncentraciju ugljikovog dioksida blizu enzima, dugoročno ipak mogu nastati problemi.





**Slika 7.** Komora s uzorcima – održavanje standardnih uvijeta

Izmjena perioda svjetlosti i tame ključna je za održavanje većine kultura. Neke vrste (primjerice kokolitoforidi otvorenih tropskih mora) kontinuirana osvjetljenost ubija. Najbolji omjer razdoblja svjetlosti i tame je između 12 : 12 do 16 : 8 sati. Alge koje imaju fikobilisome mogu preferirati manji intenzitet svjetlosti. Ostale, poput dinoflagelata, trebaju već i intenzitet. Za vrste koje žive na ekstremnim staništima vrijede i posebni uvjeti pa se za održavanje takvih kultura treba konzultirati odgovarajućom literaturom.

### **3.3. TEMPERATURA**

Temperatura je glavni čimbenik te treba biti pažljivo regulirana. Stanje se može lako mijenjati unutar kulture i laboratorija te treba biti redovito kontrolirano. Poželjno je da se temperatura maksimalno poveća ili snizi za 2 stupnja. Slatkovodni sojevi su u globalu otporniji na temperaturne varijacije nego morski sojevi. Za slatkovodne mikroalge najpoželjnija je temperatura između 15 – 20°C iako se većina održava na temperaturi od 20°C. Previsoke kao i preniske temperature mogu uzrokovati oštećenja fotosintetskog sustava, oštećenja stanica kao i poremećaje u diobi stanica.



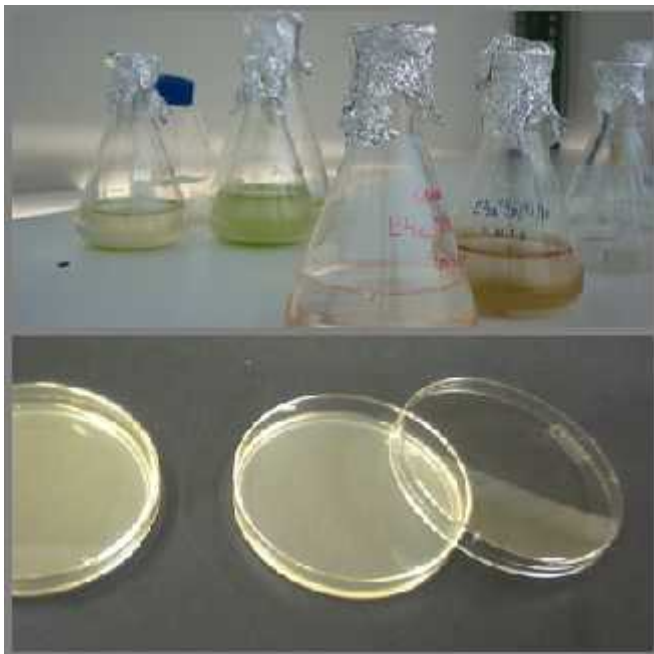
**Slika 8.** Hladnjak s uzorcima i medijima

#### **4. MEDIJ ZA UZGOJ KULTURA**

Uzgojem algi u kulturama znanstvenik može mnogo naučiti o pojedinim vrstama. Poželjno je zato stanice izlagati različitim medijima, i održavati ih na duži period kako bi se uočile njihove potrebe za pojedinim elementima, tolerancija na stres i slično. No, prvi problemi pojavljuju se pri samom odabiru medija. Alga koja se izloži mediju na koji nije otporna ili nije prilagođena na njega često mijenja morfologiju. Primjerice stanice mogu napuštati kolonije, te nastave živjeti pojedinačno, a ova pojava je i gubitak funkcionalnih flagela. Uvjeti u kulturi mogu se promijeniti s vremenom čak i ako se vanjski uvjeti (u laboratoriju) ne promjene i esencijalni elementi nisu potrošeni. Razlog tome je najčešće promjena pH ili oksidacija nutrijenata. Neke alge su ovisne o vitaminu B12 ali mogu dugo živjeti u uvjetima njegove vrlo niske koncentracije u pripremljenom mediju. Tijekom dugog razdoblja nespolnog razmnožavanja dijeljenjem neke dijatomeje postanu sve manje te se počinju spolno dijeliti da obnove velike stanice.

Nameće se pitanje kakav tip medija je bolji za uzgoj – tekući ili agar? Mnoštvo faktora utječe na izbor. Kruti medij se preferira iz razloga što je njime lakše rukovati tijekom

prijenosa i smanjuje rizik od kontaminacije. Međutim, mnogi flagelati i ostale planktonske vrste ne rastu na ili u agaru kao što neke bentiske mikroalge ne mogu dobro rasti u tekućem mediju. To pokazuje koliko je važno poznavati prirodno stanište organizama. Pri odabiru pravog medija također treba odlučiti između medija samo sa mineralnim tvarima i medija s organskim dodacima.



**Slika 9.** Uzorci u tekućem mediju i petrijevke s agarom

#### 4.1. MEDIJI ZA SLATKOVODNE VRSTE

Medije imaju tri osnovne komponente: makroelementi, elementi u tragovima i vitamini. Od makroelemenata najčešći su nitrati, silikati, fosfati, magnezij, klor, sulfati, a elementi u tragovima su cink, kobalt, molibden, selenij. Među vitaminima najvažniji je B12.

Postoji mnogo medija za slatkovodne kulture. Oni su često osmišljeni nakon što se utvrdilo prethodnim medijima da vrsta posjeduje potrebe za određenim dodacima, neki su modificirani nakon što se detaljno istražila kvaliteta vode iz koje su uzorci uzimani, neki su formulirani prema detaljnim studijama o potrebi vrsta za nutrijentima, a neki su nastali nakon proučavanja parametara u okolišu bitnih za život algi.

U globalu, slatkovodni mediji su podijeljeni u 3 grupe: sintetski ili umjetni medij, obogaćeni medij i medij koji sadrži elemente iz tla.

1. **SINTETSKI MEDIJ** je jednostavan, definirani medij namijenjen preciznim eksperimentalnim studijama ali i rutinskom kultiviranju. Najbolji primjeri su Bold's

Basal medij, BG – 11, Chu #10, WC i V medij. Mogu biti pripremljeni u tekućem ili krutom obliku.

2. **OBOGA ENI MEDIJI** se pripremaju dodatkom nutrijenata u vodu iz jezera ili potoka ili obogaćivanjem sintetskog medija ekstraktima iz tla, biljnim ekstraktima, ekstraktima kvasaca, itd. Takvi mediji nisu definirani jer voda iz jezera ili potoka može imati različite organske i anorganske molekule. U globalu, takvi mediji se ne koriste za fiziološke eksperimente ali alge redovito rastu u njima bez promjene morfoloških obilježja. Prirodna voda mora biti relativno ista i bez zagađenja. Primjeri takvog medija su: Alga – Gro medij, *Audouinella*, diatomejski, VS, Malt, *Polytoma*,...
3. **MEDIJ SA ELEMENTIMA IZ TLA** se priprema dodatkom 1 – 2 cm suhe i prosijane vrtne zemlje na dno epruvete te se doda voda. Takav medij predstavlja jezero u koje nutrijenti dolaze direktno iz tla djelovanjem bakterija i miješanja slojeva vode, dakle predstavlja prirodni medij

## 4.2. MEDIJI ZA MORSKE VRSTE

Prirodna morska voda (natural seawater = NW) je kompleksni medij koji sadrži više od 50 poznatih elemenata te velik broj organskih dodataka. Za kulture algi direktna uporaba NW je rijetko prihvatljiva.



Bez dodatka potrebnih nutrijenata i metala u tragovima mikroalge se ne mogu razvijati, dijeliti i formirati kulturu. Uspoređujući medije kakvi su se koristili prije 30 godina i danas napredak je vrlo jasan no i dalje je fitoplankton mora ostao najveći izazov za uzgoj u kulturi.

**Slika 10.** Boca sa K medijem za uzgoj vrsta iz oligotrofnih mora

Za medij je najpoželjnije oligotrofno more otvorenih oceana jer je siromašno nutrijentima i metalima u tragovima te se oni mogu dodati prema potrebi. Također, takva voda sadrži manje sedimenata i fitoplanktona pa je stoga lakša za filtriranje. Ako se koristi voda bliže obali tada se slojevi ispod piknokline imaju manje sedimenata i biomase alga. Voda se nikada ne smije uzimati za vrijeme cvjetanja mora. Uzorci vode se uzimaju najčešće plastičnim bocama te se prenesu u laboratorij na filtraciju ili se filtracija ako je moguće obavi na terenu. Za filtriranje koriste se filteri prema potrebi, ovisno o tipu morske vode i volumenu koji nam treba. Normalno bi se morska voda trebala filtrirati preko membranskih filtera veličine pora od 0.45  $\mu\text{m}$  ili u posebnim slučajevima ispod 0.2  $\mu\text{m}$ . Salinitet varira ovisno o tome gdje je voda sakupljena te u koje doba godine. Većina algi raste između 30 i 35 psu no neke vrste ne toleriraju smanjenje saliniteta. Vodu treba držati na hladnom (u hladnjaku ako je moguće) i u tami. Filtrirana voda se obično sterilizira autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C ili duže ako se radi o većem volumenu. Nakon autoklaviranja medij treba ostaviti da stoji 24 sata kako bi difundirali u njega plinovi poput CO<sub>2</sub>. Najvažniji makroelementi koji se dodaju su dušik, fosfor i silicij iako je silicij potreban uglavnom dijatomejama i silikoflagelatima. Ti su makroelementi potrebni u omjeru 16N : 16Si : 1P.

### 4.3. RECEPTI ZA NAJČEŠĆE MEDIJE

**f/2 medij** – je vrlo često korišten medij za rast obalnih morskih alga, posebno dijatomeja. 950 mL morske vode profiltrira se preko filtera GF/F. Dio te vode se prelije u drugu flašu i stavi na mješalicu gdje se dodaju komponente iz tablica. Mješalica se uključi te radi preko noći, a zatim se ulije i drugi dio vode. Na kraju se autoklavira.

**Tablica 1.** Komponente za pripremu f/2 medija

Component	Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
NaNO <sub>3</sub>	75	1 mL	$8.82 \times 10^{-4}$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5	1 mL	$3.62 \times 10^{-5}$
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30	1 mL	$1.06 \times 10^{-4}$
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—
Vitamins solution	(See following recipe)	0.5 mL	—

**Tablica 2.** f/2 otopina metala u tragovima

Component	1° Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	—	3.15 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	—	4.36 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0	1 mL	9.10 × 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0	1 mL	7.65 × 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	1 mL	4.20 × 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8	1 mL	3.93 × 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3	1 mL	2.60 × 10 <sup>-8</sup>

**Tablica 3.** f/2 otopina vitamina

Component	1° Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
Thiamine · HCl (vitamin B <sub>1</sub> )	—	200 mg	2.96 × 10 <sup>-7</sup>
Biotin (vitamin H)	1.0	1 mL	2.05 × 10 <sup>-9</sup>
Cyanocobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	1.0	1 mL	3.69 × 10 <sup>-10</sup>

**K medij** – služi za uzgoj vrsta koje žive u oligotrofnom moru, te je za bolje rezultate kao bazu bolje koristiti oligotrofno more nego obalnu morsku vodu. Postoji mogućnost da koncentracija makronutrijenata bude previsoka za neke vrste otvorenog oceana.

Medij se priprema na isti način kao i f/2 samo što se dodaju sljedeće komponente:

**Tablica 4.** Komponente za pripremu K medija

Component	Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
NaNO <sub>3</sub>	75.00	1 mL	8.82 × 10 <sup>-4</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	2.67	1 mL	5.00 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> β-glycerophosphate	2.16	1 mL	1.00 × 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	15.35	1 mL	5.04 × 10 <sup>-4</sup>
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.00129	1 mL	1.00 × 10 <sup>-6</sup>
Tris-base (pH 7.2)	121.10	1 mL	1.00 × 10 <sup>-3</sup>
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—
Vitamins solution	(See following recipe)	0.5 mL	—

**Tablica 5.** Otopina metala u tragovima

Component	1 <sup>st</sup> Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	—	37.220 g	1.00 × 10 <sup>-4</sup>
Fe-Na-EDTA · 3H <sub>2</sub> O	—	4.930 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	—	3.150 g	1.17 × 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	—	0.178 g	9.00 × 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	23.00	1 mL	8.00 × 10 <sup>-8</sup>
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14.05	1 mL	5.00 × 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7.26	1 mL	3.00 × 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.50	1 mL	1.00 × 10 <sup>-8</sup>

**Tablica 6.** Otopina vitamina

Component	1 <sup>st</sup> Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
Thiamine · HCl (vitamin B <sub>1</sub> )	—	200 mg	2.96 × 10 <sup>-7</sup>
Biotin (vitamin H)	0.1	1 mL	2.05 × 10 <sup>-9</sup>
Cyanocobalamin (vitamin B <sub>12</sub> )	1.0	1 mL	3.69 × 10 <sup>-10</sup>

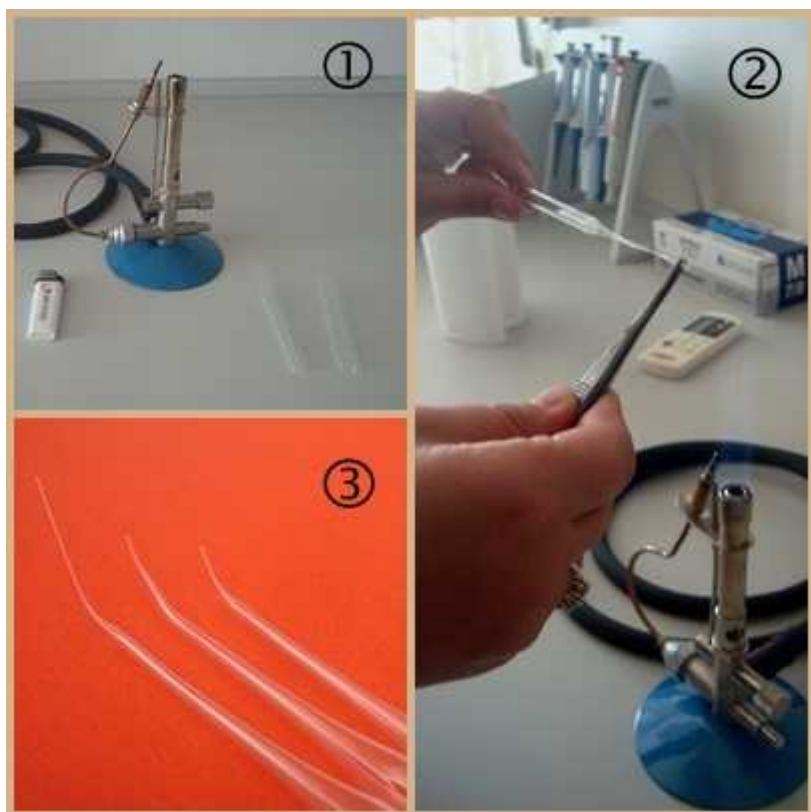
## 5. TEHNIKE IZOLACIJE MIKROALGI

Prvi korak prema uspješnoj izolaciji je poznavanje i razumijevanje uvjeta u prirodnom okolišu kako bi se odabrao povoljan medij u koji će se izolirati stanice. Nije neobično da neke vrste rastu u jednom mediju, a da nakon jednog ili više premiještanja u novi medij ponu ugibati. To je dobar pokazatelj da mediju nedostaje neki od elemenata, što se ne manifestira odmah. Na žalost, ponekad je prekasno za takve zaključke. Za morske obalne alge temperatura i salinitet su bitni dok je za fitoplankton otvorenog mora bitnija kvaliteta vode. Slatkovodne alge koje nisu uzorkovane u zimskim mjesecima su manje osjetljive na temperaturu ali može biti bitan pH. Vrste polarnih područja su logično osjetljive na povišenje temperature, jednako kao što vrste kiselih ili hiperslanih staništa zahtijevaju poseban tip medija. Poznavanje taksonomije je također bitno. Dijatomeje zahtijevaju silicij, euglenoidi amonijak a neki rodovi (npr. *Chrysochromulina*) selenij. Drugi korak uključuje eliminaciju kontaminanata, posebno onih koji konkuriraju vrstama koje se žele kultivirati. Nadalje slijede metode razrjeđivanja, izolacije stanica te praćenje njihova rasta u tekucem mediju ili na agaru. Prilikom izolacije neophodan je mikroskop i već navedeni, sterilizirani pribor.

## 5.1. IZOLACIJA POMO U MIKROPIPETE ILI KAPALICE

Vjerovatno najčešća metoda izolacije je pomoću Pasteur-ove mikropipete ili staklene kapilare.

Za postepeno Pasteur-ova mikropipeta se mora pripremiti za izolaciju. Zagrijava se nad plamenikom tako da se drži u lijevoj ruci za 'bazu' a vrh se prihvati pomoću pincete desnom rukom. Prilikom zagrijavanja pipetu se lagano rotira kako bi se zagrijala jednoliko. Ubrzo staklo omekša te se tada brzo ukloni s plamena i povuče pincetom vrh kako bi se izdužio u tanku cijevicu. Ako se povuče presnažno i prebrzo ili ako se to učini nad plamenom može doći do pucanja. Mikropipeta se može naći da bude isključivo ravna ili se kod povlačenja pincetom staklo može savinuti pod kutem. Takve mikropipete su bolje kada se izolira iz dubljeg posuda, dok su ravne primjenjuju kod plitkog budući da bi smetali objektivi mikroskopa za slobodno kretanje kroz medij.



**Slika 11.** Priprema mikropipete

1 – plamenik, upaljač, te unaprijed pripremljene mikropipete

2 – izvlačenje mikropipete; kada se vrh zagrijava nad plamenom mikropipeta se makne s plamena te se lagano povuče pincetom

3 – pravilno izvučene mikropipete

Kada se mikropipeta ohladila (a to je vrlo brzo!) pinceta se namjesti na odgovarajuće mjesto izdužene cijevice te se ona prekine. Taj korak se mora odraditi pažljivo budući da vrh može biti oštećen, a takav nije primjenjiv za izolaciju jer ne samo da će biti teže uvući i željenu



stanicu zbog smanjene preciznosti nego bi takav vrh istu mogao i oštetiti. Vrh dakle mora biti dovoljno širok da stanica lako ulazi, no opet dovoljno uzak da istovremeno ne uđe više stanica. Potrebno je malo prakse da se stekne brzina i kvaliteta u izradi. Prije izoliranja dobro je napraviti više mikropipeta, jer se tek pod mikroskopom najbolje vidi i vrh koji nije uvijek dobar, a može doći i do puknuća vrha prilikom izolacije.

Dvije su metode uzimanja stanica pomoću mikropipete. U jednoj metodi se koristi gumena, fleksibilna cijev u koju se jedan kraj stavi u usta, a u drugi se umetne mikropipeta. Gumena cijev može biti različitih duljina. Često se prakticira kraća, a ukoliko je duža prebaci se preko ramena, oko vrata da se njome lakše barata. Dok je u ustima jezikom se prekrije vrh da voda sa stanicama ne ulazi prije nego se odabere odgovarajuća stanica. Prije nego započne izolacija dobro je mikropipetu uroniti u sterilnu vodu kako bi se smanjila kapilarnost prilikom same izolacije. Gledajući kroz mikroskop potrebno je odabrati željenu stanicu i pronaći u vidnom polju vrh mikropipete. Kada je stanica naciljana jezik se makne sa cijevice te se zbog kapilarnosti voda sa stanicom sama ulazi u cijevicu, a dodatno se može lagano uvući strujom zraka vodu u cijev. Pri tome postoje i druge stanice, no iz tog razloga se rade razrijeđena dok u petrijevki ne ostanu samo ciljana stanica ili eventualno više njih od iste vrste. Kada je željena stanica u cijevici opet se jezikom prekrije vrh dok se mikropipeta ne prenese u novu petrijevku (ili neki drugi odabrani tip posuđa) sa sterilnom vodom ili medijem. Tada se jezik ponovno makne i lagano se puhne zrak u cijevicu pri čemu se izolirani uzorak biti otpušten.

Druga metoda je slična predhodno opisanoj samo što ne uključuje gumenu cijevicu. Pri tome je ključno predhodno vrh mikropipete uroniti u sterilnu vodu da ona ulazi u mikropipetu (time se ponovno smanjuje kapilarnost) te se zatim postavi iznad ciljane stanice koja se rezidualnom kapilarnošću zajedno s vodom ulazi u mikropipetu, a laganim puhanjem u nju sadržaj se otpusti u novu petrijevku.

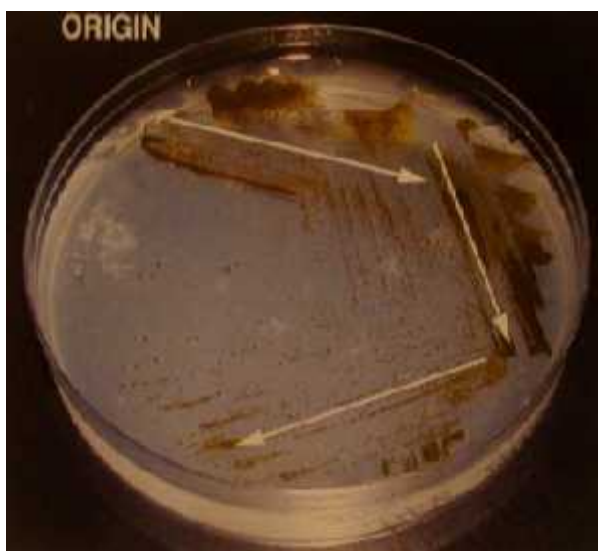
Uspješnost izolacije se provjerava pregledavanjem petrijevke putem mikroskopa te se uzorak razrijeđuje dok ne ostanu samo jedna stanica. Proces razrijeđivanja mora biti osobito brz ako se radi o stanicama (npr. dijatomeje) koje se priljube uz podlogu. Tada ih je teško izolirati a da se ne oštete. Priljubljene stanice mogu se odvojiti ispiranjem mlazom vode, tako da se prilikom izoliranja preko gumene cijevice puhne jači mlaz prema željenoj stanici pri čemu se ona odvoji od podloge i zatim uvuče u mikropipetu.

Postoje i mnoge varijacije koje se mogu primjeniti da bi u uzorku imali samo jednu stanicu; npr može se izolirati više njih, a zatim se neželjene stanice uklone ponovno pomoću mikropipete sve dok ne ostane samo željena koja se zatim prebaci sama u medij.

Ponekad u kulturi mogu problem predstavljati dijatomeje jer ih se razvije puno i otežavaju ili sprečavaju razvoj ostalih vrsta. Njihovo prisutstvo se može riješiti dodatkom germanijevog dioksida u medij prije nego se u njega izoliraju stanice. On dokazano uništava dijatomeje jer u biokemijskim reakcijama zamjenjuje silicij te je kao takav letalan za njih, dok za ostale alge nije toksičan.

## 5.2. IZOLACIJA STANICA NA AGAR

Izolacija stanica na ploče s agarom je stara i vrlo česta metoda. Ipak, ne rastu sve stanice na agaru. Dobro će se razvijati alge tla i dijatomeje, a slabo npr. dinoflagelati. U većini slučajeva koncentracija agara nije važan faktor pretpostavljajući da je agar između 0.8 i 1.5 do 2.0%. Na agaru dobro rastu i bakterije i gljive koje vrlo brzo razviju sporangije i spore te sprečavaju razvoj algi. Da bi se izbjegao njihov rast rabe se filteri i organski supstrati.



**Slika 12.** Agarna ploča sa kulturama



**Slika 13.** Petrijeveke s agarom i pribor

Stanice se mogu nanijeti na agar pomoću ežice i to na isti način kao i bakterije, tako da se rade pruge i pri tome se okreće ploča s agarom. Različitim vrstama potrebno je različito vrijeme inkubacije; za slatkovodne alge obično nekoliko dana, dok je za oceanske potrebno i nekoliko mjeseci. Kada se na agaru pojave kolonije (svaka nastala iz jedne stanice) one se opet mogu prenijeti na agar ili u tekući medij. Neke alge međutim ne rastu na površini agarove uklopljene u njega. Stanice se pomičešaju u nestvrdnuti agar i tako stave u petrijevke. Nestvrdnuti agar mora biti hladan da se izbjegne pregrijavanje i smrt algi. Hladi se dok se agar sasvim ne stvrdne. Agar se zatim stavi na inkubaciju pri odgovarajućoj temperaturi i svjetlu dok se ne razviju kolonije. Da bi se izolirale stanice iz agara mikropipeta se uroni u njega te se stanice prenesu u tekući medij.

### 5.3. IZOLACIJA MAKROALGI

Termin makroalge se koristi za alge koje formiraju višestanične taluse u barem jednom stadiju svog života. Uzgoj u kulturama je nužan kako bi se proučio i razumio razvoj od reproduktivne stanice do višestaničnog talusa. Takva proučavanja započela su u devetnaestom stoljeću.

Većina makroalgi ima visoku sposobnost regeneracije i totipotentnosti pa teoretski kultura jedne vrste u većine primjera može biti uspostavljena kidanjem vegetativnih dijelova (stanica). Ipak, često epifitske vrste ili cijanobakterije koje je teško ukloniti s površine tkiva rastu brže nego željene alge. Iz toga je razloga izolacija putem dijelova tkiva ograničena na taksonima sa apikalnim meristemskim rastom (poput smeđih algi iz reda Dictyotales, Sphacelariales i crvenih algi sa apikalnim stanicama), na sifonalne zelene alge i neke rodove sa brzim diobom stanica (*Ectocarpus*, *Ulva*). Da bi se oistila površina tkiva potreban je nježan kist. Manji fragment tkiva sa vršnim stanicama žiletom ili skalpelom se odvoji od jedinke te se stavi u petrijevku ispunjenu filtriranom morskom vodom. Nakon 1 – 2 tjedna kulture se pregledaju i odaberu iste. Ako su kontaminanti i dalje prisutni (epifiti ili stanice na dnu petrijevke) proces izolacije se ponavlja (rezanjem istih dijelova tkiva i ponovnim

prebacivanjem u novu petrijevku) sve dok ne ostane ista kultura. Fragment tkiva se može o istiti i provlačenjem kroz agar, tako da se za jedan kraj drži pincetom.



**Slika 12.** Kidanje fragmenta tkiva

(Algal culturing techniques – Andersen)



**Slika 13.** Iščepanje fragmenta kroz agar

(Algal culturing techniques – Andersen)

U ostalim slučajevima iste kulture se uspostavljaju putem zoospora, planogameta, karpospora, tetraspora, aplanospora, zigote. Ako vrsta odmah ne otpušta reproduktivne stanice može biti najprije uzgajana u laboratoriju, tzv. sirove kulture. Koristi se obogaćena voda, međutim da bi se izbjeglo bujanje epifita bolje je koristiti steriliziranu morsku vodu. Da bi se prije rasta diatomeja i cijanobakterija mogu se dodati antibiotici ili germanij dioksid. Kao i kod izolacije jednostaničnih vrsta i za makroalge je potrebno održavati uvjete temperature i dnevne svjetlosti (npr. neke smeđe alge otpuštaju reproduktivne stanice samo pri niskoj temperaturi i kratkom razdoblju osvjetljenja). Kada se zapazi formiranje reproduktivnih stanica (najčešće prema promjeni boje) kultura mora biti prebačena u mraku komoru a iduće jutro se otpuštanje stanica inducira prebacivanjem tkiva u novo posuđe s medijem te se izlaže svjetlosti visokog intenziteta.

## **6. KULTURE ALGI KONTAMINIRANE VIRUSIMA**

Pojam *virusi alga* se koristi za grupu virusa koji napadaju sve skupine algi. Dijele se na dvije grupe: cijanofagi (uzrokuju infekcije cijanobakterija) i virusi eukariotskih alga. Virus su

obligatni unutarstani ni paraziti, te se njihov životni ciklus sastoji od 3 osnovne faze: pronalazak odgovarajućeg domaćina (adsorpcija, ulazak u stanicu te ugradnja u genom domaćina), iskorištavanje domaćinovih mehanizama transkripcije, translacije i replikacije za vlastitu reprodukciju te liziranje stanice domaćina i otpuštanje vlastitih potomaka u okoliš (litička infekcija). Kod kopnenih organizama (primjerice biljaka) postoje vektori (najčešće beskralješnjaci) koji prenose viruse među domaćinima, no kod algi virusi se lako prenose u stanicu pasivnom difuzijom. Tijekom latentne infekcije genom virusa se ne ugrađuje u genom domaćina ali se dijeli i umnožava zajedno sa stanicom te se prenosi u stanice kćeri i može ostati prisutan generacijama. Virusi uzrokuju propadanje kulture. Virusi se u stanicama alga mogu detektirati epifluorescentnom mikroskopijom (EFM) i transmisijom mikroskopijom (TEM), pri čemu se transmisijom elektronskim mikroskopom osim detekcije može odrediti i morfologija virusa. Stanice koje su napadnute virusima obično gube pokretljivost i padaju na dno, mijenjaju boju budući da gube pigmente te se međusobno agregiraju. Kod makroalgi nabubre reproduktivni organi, gube se pigmenti te je smanjen rast jedinice. Virusi se najlakše prenose u kulturu putem kontaminiranog medija. Jedinice na koje se unište virusi jest autoklaviranje na 121°C. Niže temperature nisu dovoljne da se unište stanice virusa a nije u inkubatoru sterilizacija putem filtera jer virusi prolaze kroz njegove pore.

## 7. LITERATURA

- Andersen R. A. 2005. *Algal culturing Techniques*, Phycological Society of America
- Beijerinck M. W. 1890. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot. Zeitung* 48:725 – 39, 741 – 54, 757 – 68, 781 – 85.
- Beijerinck M. W. 1893. Bericht über meine Kulturen niederer Algen auf Nährgelatine. *Zentralbl. Bakt.* 13:781 – 86.
- Beijerinck M. W. 1901. Über oligonitrophile Mikroben. *Zentralbl. Bakt.* Ser. II 7:561 – 82.
- Cohn F. 1850. Nachträge zur Naturgeschichte des *Protococcus pluvialis* Kützinger (*Haematococcus pluvialis* Flotow). *Nov. Act. Leop. Carol.* 22(2):605 – 764.
- Famintzin A. 1871. Die anorganischen Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklung niederer chlorophyllhaltiger Organismen. *Bull. Acad. Sci. St. Peter.* 17:31 – 70.
- Guillard R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L., and Chanley, M. H., eds. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 26 – 60.

- Guillard R. R. L. and Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cycoitella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8:229 – 39.
- Keller M. D., Selvin R. C., Claus W., and Guillard R. R. L. 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.* 23:633 – 8.
- Klebs G. 1896. Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. G. Fischer, Jena, Germany.
- Pringsheim E. G. 1946. Pure cultures of Algae. Their preparation and maintenance. Cambridge University Press, Cambridge.
- Provasoli L. 1958. Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Ann. Rev. Microbial.* 279 – 308.
- Zumstein H. 1900. Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. *Jahrb. Wiss. Bot.* 34:149 – 98.
- [www.agr.unizg.hr/cro/nastava/ms/moduli/doc/ag2103\\_plankton\\_bentos.pdf](http://www.agr.unizg.hr/cro/nastava/ms/moduli/doc/ag2103_plankton_bentos.pdf)
- [www.aquaculturestore.com/info/microal.html](http://www.aquaculturestore.com/info/microal.html)
- [www.ccmp.bigelow.org](http://www.ccmp.bigelow.org)
- [www.oilgae.com/algae/oil/biod/cult/cult.html](http://www.oilgae.com/algae/oil/biod/cult/cult.html)
- [www.zastitamora.org/vrste/algae-\(alge\).aspx](http://www.zastitamora.org/vrste/algae-(alge).aspx)
- [www.znanost.com/clanak/alge-hrana-buducnosti](http://www.znanost.com/clanak/alge-hrana-buducnosti)

## 8. SAŽETAK

Jednostani ne alge (mikroalge) i makroalge igraju važnu ulogu u ekologiji planeta jer su odgovorne za gotovo 45% globalne produkcije kisika te su osnova hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima. Ipak, vrlo je teško odrediti njihov kvantitativni doprinos ekološkoj dinamici i biogeokemijskim kruženjima. U ovome radu opisane su najčešće tehnike uzgoja algi u kulturama, te su u globalu podjeljene na tehnike izolacije mikroalgi i makroalgi.

Razvijeni su različiti mediji za izolaciju i kultivaciju slatkovodnih i morskih algi, a za neke se vrste koristi agar. Kako bi se odabrao povoljan medij, potrebno je poznavati ekologiju i fiziologiju vrste.

Eksperimenti sa kulturama jesu i ostale iznimno bitni za razumijevanje važnosti i uloge algi u ekosustavu.

## 9. SUMMARY

Single – celled algae (microalgae) and macroalgae have a vital role in the ecology of the planet, being responsible for roughly 45% of global productivity supporting food webs in water ecosystems. However, trying to quantify their contribution to ecological dynamics and biogeochemical cycles remains a daunting process for various reasons. In this work most common algal culturing techniques are presented, with the focus to isolation techniques as well as maintenance of micro- and macroalgae cultures.

Various culture media, as well as agar plates have been developed and used for isolation and cultivation of freshwater and marine algae. It's important to know the ecology and physiology of each species in order to choose right medium.

Experiments with cultures are and will remain crucial in a processes of understanding how algae responses to environmental variability.